

微型電胞膜穿孔晶片及其在基因轉殖之應用

本文主要介紹應用微機電製程技術改良傳統電胞膜穿孔轉殖方法，開發相當細胞等尺寸或以下的電胞膜穿孔基因轉殖平台，對於其物理性原理、應用、設計、製程技術開發及如何與生物技術結合等方面加以介紹，並以目前實驗結果評估未來開發方向與發展潛能。

林裕城、李明、黃明遠

一、前言

細胞基因轉殖是一項刪除、轉變或增加生物基因的技术，藉由外力或載子的協助將具有特定生物反應機制的 DNA 輸送進入細胞或細菌內，藉以產生蛋白質作為醫療或製藥的功效，目前從文獻中發現作為基因轉殖技術中基因投遞 (deliver) 方法，可分為兩類：病毒法及非病毒法。病毒法依照病毒載體的種類又可細分為：腺病毒 (adenovirus)、逆轉濾過性病毒 (一種致癌病毒, retrovirus) 及皰疹病毒 (herpesvirus) 等。非病毒法可細分為：微注射法 (micro injection)、脂胞法 (liposomes)、雷射誘導法、基因槍、鈣離子法、電脈衝胞膜穿孔法

(electroporation) 及結合以上數種方式的方法等。在以上所述的方法中各有優缺點，例如以病毒法所進行的轉殖技術就必須考慮載子本身是否將病毒萃取的完全，否則可能引起嚴重的後果。1999 年 9 月在賓州大學以病毒法進行基因治療的人體實驗中，發生第一起基因治療的死亡案例，使得基因治療的安全性更受到研究人員的重視。而非病毒法的各項技術則通常含有價格昂貴、轉殖的侷限性與過程複雜等缺點，因此真正應用於臨床醫療的實例少之又少。

而非病毒法中以電脈衝胞膜穿孔法應用較廣，工程上屬物理性應用技術。電脈衝胞膜穿孔法的優點主要有以下幾點：

1. 過程簡單而且快速。
2. 適用於各種細胞 (病毒法中細胞必須藉由特定的病毒感染)。
3. 可以傳遞基因以外的大型分子或藥物。
4. 成功的應用於原核 (prokaryotic) 及真核 (eukaryotic) 細胞。

林裕城先生為美國伊利諾大學博士，現任國立成功大學工程科學系副教授。

李明先生為國立成功大學工程科學系博士班學生。

黃明遠先生為國立成功大學工程科學系碩士，現任職於晶宇生物科技實業股份有限公司。

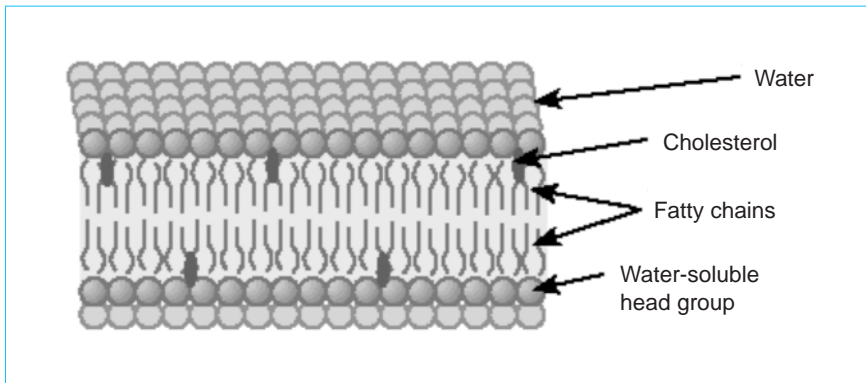


圖 1. 細胞膜示意圖⁽⁴⁾。

微機電平台的開發始於 1980 年代，它原本是一種半導體製程的衍生技術，目前更因為材料的開發與超精密加工技術的精進大幅增進其使用性，更由於尺寸介於數百微米至幾微米，與細胞尺寸相近，甚至更小，因此相當適合作為生物組織的感測器或輸送工具。由於製程技術的成熟，微機電的設計開始應用於電胞膜穿孔 (electroporation) 的研究上^(1,2)；1999 年柏克萊大學 Huang & Rubinsky 設計新型微晶片作為實驗平台，研究單一細胞在電胞膜穿孔狀態下電壓與電流的關係⁽³⁾。

二、細胞膜電性機制與原理

1. 細胞膜的性質

細胞膜是由脂質 (lipid) 所組成的雙脂層薄膜 (bilayer)，如圖 1 所示，每一層都是由許多含有磷酸根的親水性頭部 (hydrophilic polar head group) 和脂肪酸所構成的疏水性尾部 (hydrophobic tail) 一齊排列而成，頭部朝外直接與細胞內外的水溶液接觸，而具有抗水性的尾部則向內緊密排列，這種結構可以使一般大型水溶性分子無法自由通過細胞膜，細胞膜上除了磷脂質 (phospholipids) 為主要成分，另外還有膽固醇 (cholesterol) 與蛋白質等物質所組成，如果細胞膜所含的膽固醇比例越高，膜的硬度也會增高，這些都會影響實驗參數的設計，而細胞膜的厚度是會因細胞種類而異，一般厚度約為 2 - 6 nm，通常細胞膜只有 1 - 2 層磷脂層，因此胞膜厚度在 12 nm 以下，特殊的細胞由於功能性的問題，有數百層磷脂層在細胞外圍，如皮膚細胞外圍的角質層 (corneum)。

2. 電胞膜穿孔原理

細胞膜上有許多通道 (aqueous pathway) 溝通細胞內外的離子，維持細胞內的平衡，這些分佈在細胞膜上的水通道半徑約為 1 nm。以皮膚細胞為例，估計約有 105 個孔通道。以能量的觀點而言，細胞膜相當於電位障 (barrier) 橫跨介電薄膜的兩邊，細胞膜內外的離子或帶電粒子的電位差異造成電位障差 (ΔW)，電位障差可以轉換成穿膜電位 (transmembrane potential)。

假設以一個球狀模型來說明細胞與外來電場的關係，當外界電場建立之後，可以產生穿膜電位，並且隨著電場增加而變大；相同的電場下，大的細胞可以獲得比較大的誘導穿膜電位，所以電胞膜穿孔與細胞尺寸有關⁽⁵⁾。

$$\Delta U = 1.5 ER \cos \varphi$$

ΔU ：電場誘導的穿膜電位 (induced transmembrane potential)

E ：外界電場

R ：細胞半徑

φ ：電場方向與細胞膜法線方向的角度

當電場造成的誘導穿膜電位超過原生膜電壓 (born transmembrane voltage) 會造成胞膜上的水通道增加，使得胞膜內外導通，以電學的角度看起來像崩潰 (breakdown) 的現象，造成瞬間胞膜放電，所以越高的胞膜電位差會產生越大的驅動力，帶動離子或帶電分子進出細胞。例如小型離子 (Na^+ 、 K^+ 、 Cl^-) 都可以藉由水通道自由通過細胞膜，達到

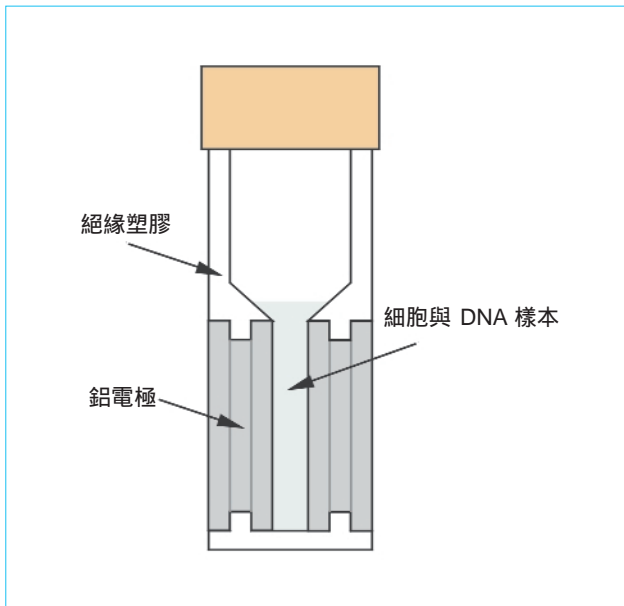


圖 2. 傳統電胞膜穿孔實驗的反應器 cuvette 示意圖。

平衡電位的效果，而水通道的數量與直徑都會隨著穿膜電壓產生變化，使得胞膜表面的通道數量增加與孔徑增大，更多的離子通過胞膜以求平衡內外的電壓。

因此施以高於細胞穿膜電位的脈衝電壓將會造成細胞暫時性或永久性的破壞，而穿膜電位大小則必須考慮細胞種類、胞膜厚度及目標物的尺寸等；如皮膚細胞角質層厚，則穿膜電位比一般的細胞高，約 30 - 100 V (一般細胞為 1 V)⁽⁶⁾。

三、傳統電胞膜穿孔技術



圖 3. cuvette 實體圖。

目前的電胞膜穿孔實驗大部分為試管實驗 (in-vitro)，所使用的反應腔體以透明試管 (cuvette) 為主，如圖 2 與圖 3 所示，利用平行電極板建立均勻的電場，已經成為規格化的商品，依據電極的間距區分規格，有 1、2、4 及 10 mm 間距四種，常見的規格為 2 mm 電極間距，有效的容量為 0.5 mL。

另外一種反應腔的設計，簡化了電胞膜穿孔的實驗流程，將貼附型細胞直接培養在反應腔內，減少處理細胞的步驟，稱為「in-situ cuvettes system」，如圖 4 與圖 5 所示。

在活體上 (in-situ) 的研究分為體內及體外研究，體內研究大部分集中在基因治療 (gene therapy) 與癌症治療方面，以侵入式針狀電極產生非均勻性電場，進行局部的電胞膜穿孔，如圖 6 所示；體外的研究則放在皮膚的藥物傳送 (drug delivery)，利用非侵入式平面電極建立電場，使藥物穿透皮膚角

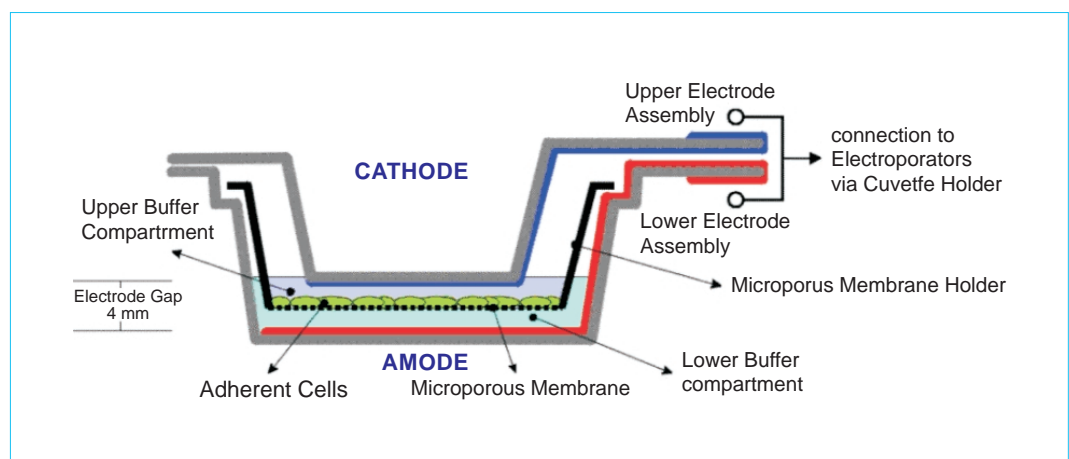


圖 4. in-situ cuvettes 示意圖 (from Equibio)。



圖 5. in-situ cuvettes 實體圖 (from Equibio)。

質層，進入皮膚組織中，目前都已經有商品出現，如圖 7 與圖 8 所示。

四、微型電胞膜穿孔實驗設計

要進行電胞膜穿孔實驗必須考慮轉殖的細胞與質體的選擇，針對實驗對象選擇適當的培養方式，接下來再針對晶片的設計與偵測的方式選擇具有生物相容性的材料，另外還有脈衝週期、電壓，交直流電流與滲透壓等參數問題，可以在實驗設計完成後，依據細胞性質與晶片設計來加以調整，因此僅就前述四項加以介紹。

1. 晶片材料選擇

材料的選擇必須考慮到生物相容性 (如表 1 所示) 與製程溫度等限制，其中可分成金屬與非金屬兩類。金屬類目前常見的材料有金、鈦、鎳、白金及鋁等材料，目前半導體工業常用的矽、銅製程並不適合生物上的應用。非金屬方面，以氧化矽與高分子聚合物為主，氧化矽具有良好的光學性質、絕緣性與製程相容性，相當適合做為生物偵測載台，而合成與天然高分子的複合物不僅具有上述的優點，更因為接近組織構造 (如聚乳酸共聚物) 被大量應用於人體植入物的材料，如人工水晶體、人工角膜與隱形眼鏡，皆由人工合成高分子材料製成，由於生物體組織會對植入外物產生抗體排斥作用；

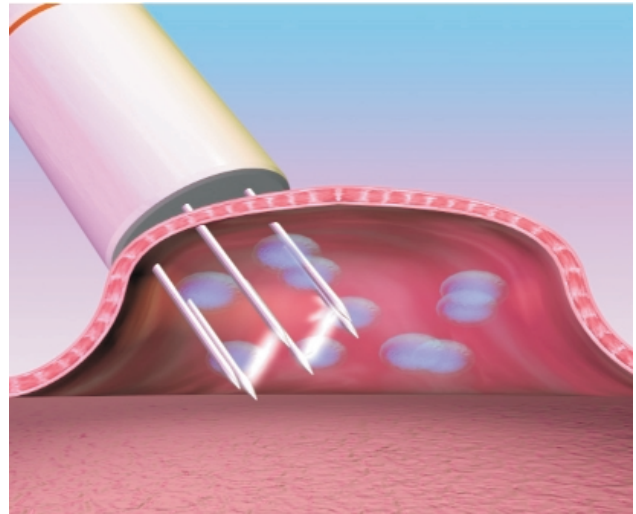


圖 6. 以針狀電極進行局部 electroporation 示意圖 (from Genetronics)。



圖 7. 手術型 in-vivo electroporation 設備，脈衝產生器及侵入式針狀電極 (from Genetronics)。

因此對於材料的選擇必須十分注意，以過去的經驗來說，使用化學穩定性較佳的高分子材料 (如聚乙烯、聚醯胺、聚酯、聚碳酸酯、聚胺基甲酸酯、聚矽氧烷、聚四氟乙烯) 已經成功地被應用於以上所述的人工代替品之中，至於天然合成的高分子材料應用則更為廣泛，例如具有纖維狀微結構特性的膠原蛋白分子群，是從生物體結締組織 (腱、軟骨、

圖 8.
掌上型皮膚 in-vivo electroporation 設備，非侵入式平面電極 (from Genetronics)。



皮膚、骨、血管) 中萃取出來，可直接應用於組織修補，另外多醣類中的幾丁聚醣 (chitosan) 與透明質酸 (hyaluronic acid, HA) 也可以分別作為創傷再生、眼科材料、皮膚保健、健康食品與藥物控制釋放的應用。

所以實驗中考慮製程與長時期細胞培植等因素，採用了金、鈦、氧化矽與 PMMA (polymethyl methacrylate) 等作為晶片製程材料。

2. 晶片設計與製程

電脈衝胞膜穿孔晶片的設計主要是代替傳統轉殖用容器 (cuvette) 作為反應器，對細胞進行電脈衝胞膜穿孔，將質體 DNA 輸送到細胞內。目前已經有部分轉殖的研究以微機電系統作為實驗平台，且依細胞的狀態可分為兩類，第一類是細胞懸浮時進

行，這類的元件設計大致分為微流道、反應區與電極設計三大部分，本文作者曾以 PMMA 作為微流道基材配以微型電極製成轉殖晶片 (如圖 9 所示)，對肝臟癌細胞 (Huh-7) 以 10 V 以下的低工作電壓進行轉殖⁽⁷⁾，把 pSVLa2 plasmids 送進細胞加以觀察，除此之外，更有對單一細胞進行轉殖的研究⁽⁸⁾。

第二類轉殖晶片的設計是針對貼附型細胞 (如圖 10 所示)，由於細胞必須有較長的時間在晶片上培養，相對於材質的選擇就必須更加注重生物相容性的問題，而這種晶片的優點是結構較為簡單，有利於低成本的開發，這類型的晶片本身也可放置於光學平台上，在原位加以觀察其實驗的過程與結果⁽⁹⁾。

另外，微型技術由於體積小與電壓低，可以應用於活體組織方面的基因治療，除了針型陣列電極設計之外，Mari Dezawa⁽¹⁰⁾ 所設計的鑷子型電極，將注入眼球中的 DNA 殖入視網膜中，也是一項實用的設計 (如圖 11 所示)。

表 1. 生物參數參考表。

Parameter	Value	Location
pH	6.8	Intracellular
	7.0	Interstitial
	7.15 - 7.35	Blood
Temperature	37 °C	Normal Core
	28 °C	Normal Skin
Mechanical Stress	$4 \times 10^7 \text{ Nm}^{-2}$	Muscle (peak stress)
	$4 \times 10^8 \text{ Nm}^{-2}$	Tendon (peak stress)
Stress Cycles (per year)	3×10^5	Peristalsis
	3×10^5	Heart muscle contraction

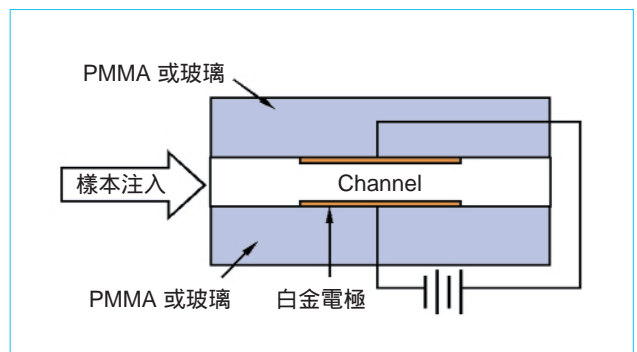


圖 9. 流道式微型轉殖晶片。

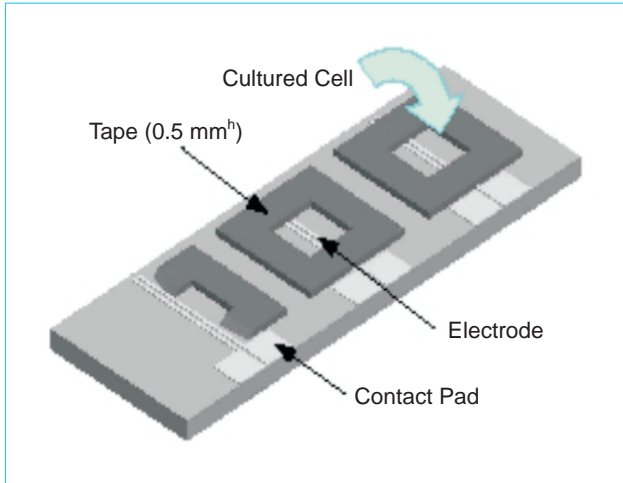


圖 10. 貼附型晶片設計。

3. 細胞前處理生物技術

在無塵室裡所製造的晶片，其潔淨度雖然很高，但是並非直接可以應用於生物檢測上，這是因為製造的過程並非採用無菌處理，一般來說以紫外線照射與高溫高壓滅菌法較為常用。滅菌好的晶片如果是玻璃為底材，則必須添加 collagen 或 poly-D-lysine 等，使其表面改成親水性或增加分子力，藉以使細胞容易附著。接下來以濃度 0.5% 的 Trypsin-EDTA 將細胞由培養皿中取下經過離心分離、萃取、細胞計數與存活測試，配出實驗所使用的細胞濃度之後，再以滴定管加入晶片微型槽當中，然後將晶片放在溼度 95%、CO₂ 濃度為 0.5%、溫度 37 °C 的恆溫無菌環境中加以培養，經過 24 小時後細胞將逐步貼附、增生而穩定。實驗前將晶片上培養基吸取乾淨，以 D-PBS 洗滌細胞

一至二次，其目的是要去除培養基中添加的胎牛血清 (FBS) 所存留的脂蛋白 (lipoprotein)，最後就是要將混和好的 GFP-DNA 滴入微型培養槽中靜置數分鐘後開始電擊。

4. 質體 DNA 選擇

質體是位於細菌或細胞中的環狀雙鏈 DNA 分子，屬於染色體外的 DNA，不同於一般染色體一顆細胞只有一對，常常以多份拷備的方式存在於細菌中，而且容易被重組，將外來 DNA 片段插入限制酶作用的位置，以實驗中所使用的綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 為例，這種最初於水母身上所發現的蛋白質是分子生物學家最喜歡的工具之一，只要把 GFP 基因嵌入生物體的基因中，就可使由該基因產生的蛋白質分子具有會發光的 GFP 標誌，如圖 6 所示，GFP 的 DNA 序列被插在質體 DNA 上。

當質體 DNA 被植入細胞內後，DNA 會進行蛋白質製造，這個過程稱為轉譯，質體 DNA 在轉譯的過程中，同時會將插入其中的 GFP 的 DNA 功能同時加以轉譯，一般常用的 DNA 質體是 plasmid pRAY 1、GFP⁽¹⁾，本實驗中轉殖成功的細胞質體將會以 pEGFP-N1 Vector 為模板，將位於環狀質體上第 679 - 1398 位置上的遺傳密碼子轉譯成綠色螢光蛋白質，使得細胞膜內充滿螢光蛋白質，藉以確認細胞的基因轉殖成效。

GFP DNA 進入細胞後，細胞會以 GFP DNA 為模板，製造出綠色螢光蛋白 (GFP)，使得細胞膜內充滿螢光蛋白質，以便在螢光顯微鏡下觀察；

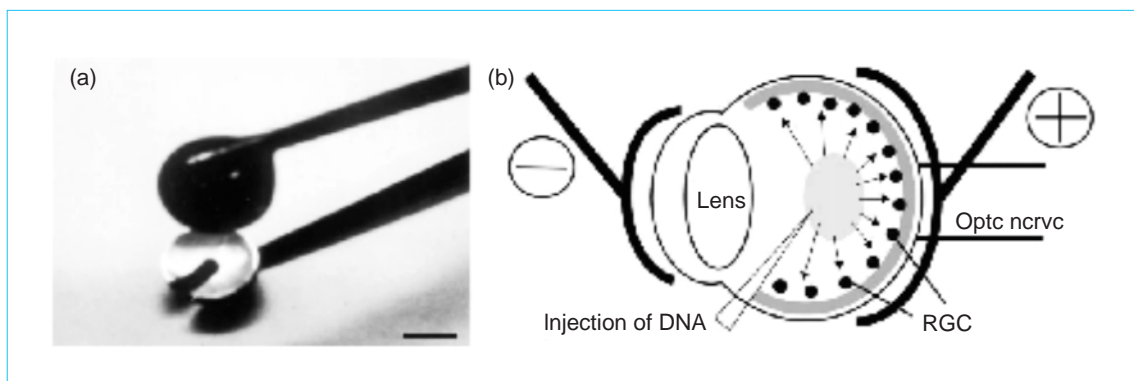


圖 11. (a) 電極設計，(b) 工作原理。

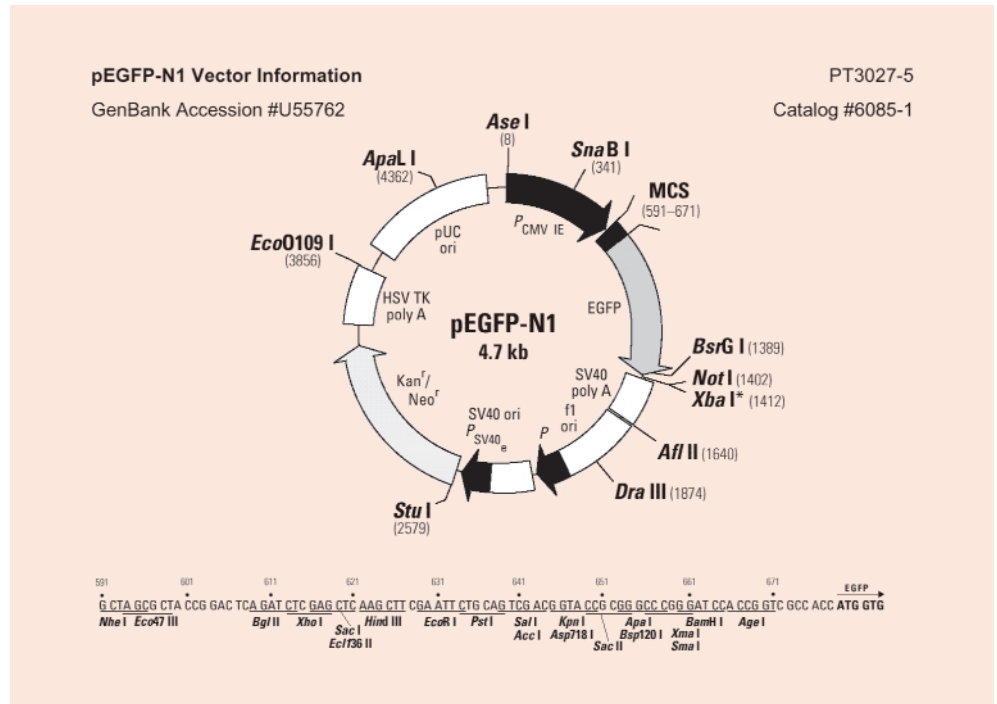


圖 12. pEGFP-N1 質體基因環型圖譜。

螢光物質吸收短波長的光能，放射出長波長的光，GFP 的激發波長為 488 nm (藍光)，發射波長為 507 nm (綠光)，轉殖成功的細胞，利用螢光顯微鏡搭配適當的濾鏡組，便可判讀轉殖細胞的數目。

5. 光學定性偵測分析

基因轉殖成功的細胞會開始製造螢光蛋白 GFP，經過 24 小時的培養後，GFP 的濃度提高，在便可以產生在螢光顯微鏡下觀察轉殖結果，計算綠色螢光細胞的數量以反應轉殖的程度。

實驗中採用 Olympus BX 40 螢光顯微鏡，搭配濾光鏡組 U-MWIB (excitation 460 - 490 nm, emission 515 nm~)，如圖 13 所示，影像擷取系統是 Pixera 600CL Cooled CCD 配合桌上型電腦，即時擷取螢光影像。

五、結果與討論

利用微機電技術所製造的轉殖晶片不僅可以廣泛的應用於多種細胞株，如 Huh-7、Chang-liver、HAPG2 等腎臟癌、肝癌細胞，即使人體正常細胞如血管細胞 (human umbilical vein endothelial) 也可

以獲得相同的效果 (如圖 14)。電胞膜穿孔技術在傳統轉殖細胞容器中，轉殖電壓場高達數百伏常造成細胞極高的死亡率，即使臨床醫療上也有極大的副作用。目前上市的機型 multiporator (Eppendorf Scientific Inc., USA) 對原生細胞：microvascular endothelial (rat heart) 以 400 V 工作電壓工作，細胞殘存率為 10%，轉殖率也僅為殘存細胞的 18.5%。以本實驗室為例，目前可將和上述相同型態的血管

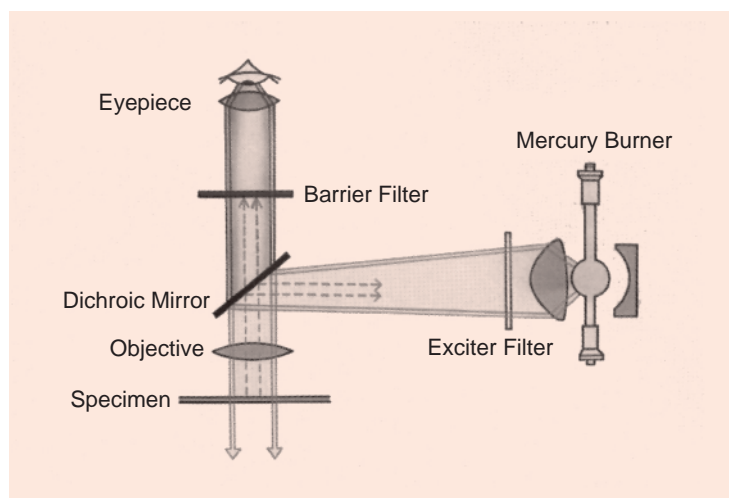


圖 13. 顯微鏡光路示意圖。

原生細胞，以 4 V 的工作電壓進行電胞膜穿孔，如果扣除因電、熱效應造成的細胞死亡數目，實驗的轉殖率可達到殘存細胞的 12%，而細胞的生存率卻可提高到 87%，只要配合相關的生物機制將能有效的提昇轉殖率與降低焦耳熱與電分解 (lysis) 的作用。

六、結論

微型電胞膜穿孔晶片所需的脈衝驅動電壓不高，低於 10 V，功率消耗在 0.1 W/pulse 以下，可由一般電池作為電源供應裝置，因此脈衝產生器可以縮小成掌上型系統，使得細胞基因轉殖的實驗可以掌上操作，提高實驗的移動性，並且有機會成為居家型醫療商品。而用途方面，轉殖晶片具有脈衝電壓低與副作用小等優點，除了基因治療外，只要改變電極設計或增加一個較低的起始電流，則有助於藥物傳送 (drug delivery)，藥物可以是蛋白、酵素或其他帶電分子，增進藥物的療效及治療速率，最近幾年針對表皮細胞藥物輸送的研究逐漸增加，目前已經有商品出現，所以未來基因工程越趨於成熟，此一微型電胞膜穿孔晶片將是一項不可或缺的工具。

參考文獻

1. G. L. Prasanna, T. Panda, and P. P. Rao, *Bioprocess Engineering*, Springer-Verlag, **16**, 265 (1997).
2. J. A. Lundqvist, F. Sahlin, M. A. I. Aberg, A. Stromberg, P. S. Eriksson, and O. Orwar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10356 (1998).

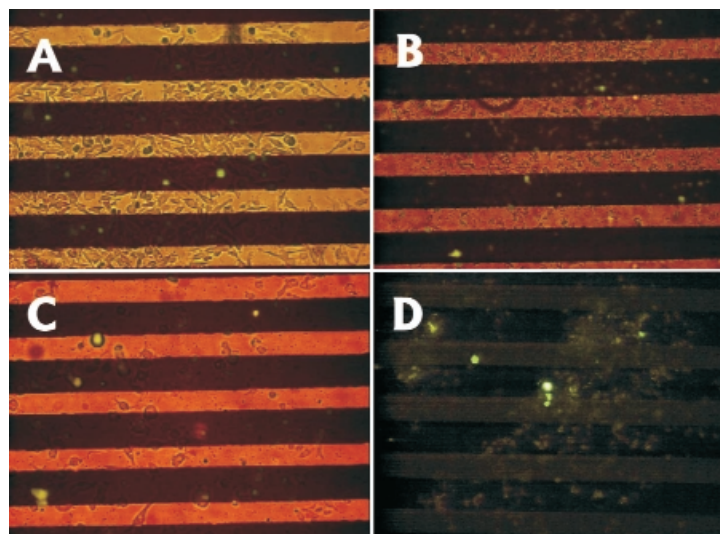


圖 14. (A) Chang-Liver, (B) HUVEC, (C) HAPG2, (D) Huh-7。

3. Y. Huang and B. Rubinsky, *Biomedical Microdevices*, **2** (2), 145 (1999).
4. A. David, *Cell Based Biosensors Using Microelectrodes*, Ph. D. Thesis (1998).
5. J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41, Issue: 2, December, 135 (1996).
6. M. R. Prausnitz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **35**, 61 (1999).
7. Y. Huang and B. Rubinsky, *Biomedical Microdevices*, **2** (2), 145 (1999).
8. Y. C. Lin. and M. Y. Huang, *J. Micromech. Microeng.*, 1 (2001).
9. G. A. Hofmann, S. B. Dev, S. Dimmer, and G. S. Nanda, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **46**, 6 (1999).
10. M. Dezawa, M. Takano, H. Negishi, X. Mo, T. Oshitari, and H. Sawada, *Micron*, **33**, 1 (2002).
11. J. A. Lundqvist, F. Sahlin, and A. I. Maria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10356 (1998).